

Application News

No. MS-36

LCMS-9050 - Espectrômetro de Massas HRAM para Cromatógrafo Líquido

Maximizando a produtividade Proteômica com o microfluxo e o desempenho do LCMS-9050: velocidade, robustez e consistência analítica

Anally R. S. Menegasso¹, Marcos A. Pudenzi¹, Ichiro Hirano¹, Aline Castro R. Lucena², Diogo H. Kita², Alan de A. Veiga², Lauro Mera de Souza²

¹ Shimadzu do Brasil; ² Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe

Benefícios do Usuário

- ◆ Análise por injeção direta em modo DIA;
- ◆ Sensibilidade, reprodutibilidade e robustez para análise proteômica

Introdução

A proteômica consolidou-se como uma ferramenta essencial para a caracterização abrangente de sistemas biológicos, permitindo a identificação e quantificação de proteínas em larga escala com alta sensibilidade e precisão. Modelos experimentais baseados em culturas celulares contribuem para a padronização das análises, favorecendo a geração de dados comparáveis e de alta qualidade. Dentre as estratégias de espectrometria de massas, a aquisição independente de dados (DIA) destaca-se pela ampla cobertura proteômica, excelente reprodutibilidade e consistência quantitativa, sendo ainda potencializada pelo desempenho do espectrômetro LCMS-9050. Esta plataforma (Figura 01) combina alta resolução e acurácia de massa com velocidades de aquisição ultrarrápidas de até 200 Hz, permitindo maior densidade de pontos ao longo dos picos cromatográficos e resultando em melhor definição quantitativa e maior confiabilidade dos dados em experimentos DIA.

A utilização de microfluxo reforça essa proposta ao proporcionar maior robustez operacional, redução de intervenções técnicas e elevada reprodutibilidade entre corridas, quando comparada ao nanofluxo. Adicionalmente, possibilita maior *throughput* analítico, mantendo níveis adequados de sensibilidade para diversas aplicações proteômicas. Dessa forma, a integração entre microfluxo e aquisição DIA utilizando a plataforma Nexera Mikros – LCMS-9050 representa uma estratégia eficiente e escalável para análises proteômicas de alto desempenho, aliando produtividade, robustez e confiabilidade dos resultados.



Fig. 01 Workflow proposto para análise proteômica de alta performance — solução analítica desenvolvida com foco em alta produtividade, estabilidade e reprodutibilidade, sem comprometer a sensibilidade e a alta resolução espectral.

Preparo de amostra

As diferentes linhagens (MCF-7, HeLa e CACO-2) foram cultivadas (meio DMEM-F12). As células foram previamente lavadas com PBS 1X. Os pellets foram ressuspensos em tampão de lise contendo 10% SDS e 100 mM TEAB (pH 8,5), seguido de aquecimento a 95 °C por 5 min para desnaturação proteica. O material genético foi degradado com nuclease, e os extratos foram centrifugados (14.000 × g) para remoção de detritos insolúveis. A concentração proteica foi determinada, e alíquotas de 100 µg foram submetidas à redução das pontes dissulfeto com ditiotreitol e alquilação dos resíduos de cisteína com iodacetamida. A digestão foi realizada com tripsina grau LC-MS utilizando o protocolo S-Trap (Protifi), permitindo a remoção eficiente de detergentes. Os peptídeos foram eluídos, secos e ressuspensos em fase A para análise por espectrometria de massa.

▪ **LC-MS/MS HRAM - CONDIÇÕES ANALÍTICAS**

As condições analíticas são mostradas na Tabela 1. A estratégia apresentada utiliza Nexera Mikros (Shimadzu) para entrega de microfluxo real e reproduzível; fonte de ionização DuoESI (Newomics) para alta sensibilidade e aquisição de dados em modo DIA (Data Independent Acquisition).

Tabela 1- Condições analíticas LC-MS/MS

Coluna	L-column ODS 2 (0.3 mm × 150 mm, 2 µm, CERI)
Fase móvel	A – 0,1% de ácido fórmico em água B – 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila
Programa de tempo	0,01 min = 7% B; 0,01 - 2 min = 7% B; 2 – 15 min = 15% B; 15.01- 49 min = 40% B; 50 – 55 min = 80%B; 55.01 min = 7%B; 65 min = Stop
Fluxo	9 µL/min
Temperatura do forno	40 ° C
Interface	ESI + / emitter 8 nozzle, 10 µm (NewOmics)
Vol. injeção	2.5 µL
Voltagem do probe	3 kV
Temperatura DL	250 ° C
Temp. Block heater	400 ° C
Fluxo de gás nebulizador	1.8 L/min
Loop Time	4,8 s
Precursor ion m/z	400-1000
ToF Start – ToF End	100 - 1700
Q1 Resolution	25



▪ **PROCESSAMENTO DE DADOS**

O software PEAKS Studio (v.13) foi utilizado para o processamento dos dados adquiridos. Os parâmetros de análise foram: banco de dados UniProt Homo sapiens (Accured; 20.650 entradas); enzima: tripsina; número máximo de sítios de clivagem perdidos: 1; faixa de comprimento dos peptídeos: 7–25 aminoácidos; faixa de carga dos precursores: 1–4; faixa de m/z dos precursores: 400–1000; faixa de m/z dos fragmentos: 100–1700; modificação fixa: carbamidometilação; modificações variáveis: oxidação e acetilação; número máximo de PTMs variáveis por peptídeo: 1; FDR ao nível de grupo proteico: 1% e FDR ao nível de precursor: 1%. Análise estatística dos dados foram feitas utilizando Python, tendo como entrada planilha exportada do Peaks.

▪ **RESULTADOS**

Três linhagens de células humanas (MCF-7, HeLa e CACO-2) foram processadas de acordo com o workflow descrito na Figura 01, com o objetivo de demonstrar a performance da plataforma analítica Mikros-9050 em análises proteômicas de larga escala. Os cromatogramas obtidos por aquisição independente de dados (TIC – DIA) para cada linhagem celular são apresentados na Figura 02 (A. MCF-7; B. CACO-2; C. HeLa).

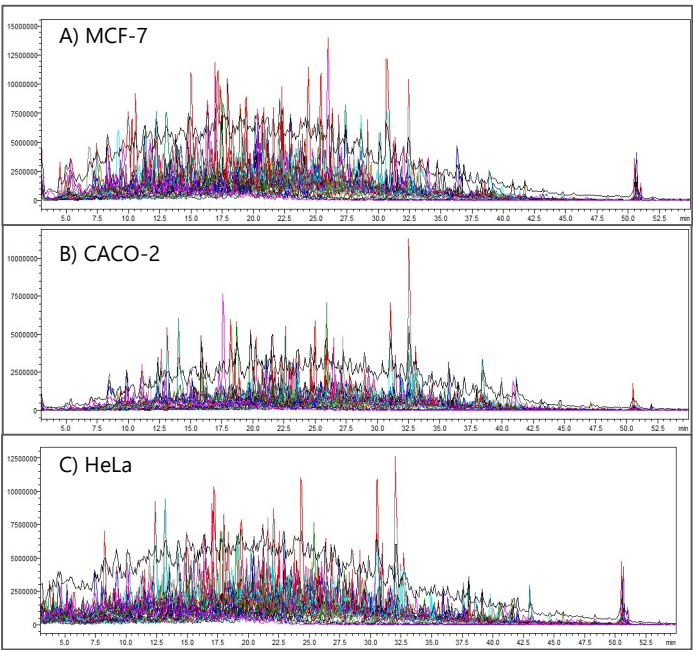


Figura 02. Cromatograma de íons totais (TIC) de dados adquiridos em modo DIA (25 eventos) para as linhagens: **A)** MCF-7; **B)** CACO-2 e **C)** HeLa.

Os resultados (triplicata de injeção) obtidos através do Peaks Studio (v.13) podem ser observados na Tabela 02. Os dados indicam alta qualidade e consistência dos dados proteômicos adquiridos pela plataforma. Observa-se elevado número de precursores, peptídeos e proteínas identificadas por injeção, com valores altamente reprodutíveis entre as replicatas de cada linhagem celular. A relação Precursor/MS2 acima de 190% para CACO-2 e acima de 250% para HeLa e MCF-7 reflete aquisição eficiente de MS/MS em modo DIA, alta cobertura proteômica e excelente aproveitamento espectral.

Tabela 02 – Resultados estatísticos para proteômica shotgun das 3 linhagens celulares (dados gerados por Peaks Studio, v.13)

	#MS Run	#Scans		#Precursors	#Peptides	#Sequences	#Proteins			#Precursors/#MS2
		MS1	MS/MS				Groups	All	Top	
Total	9	5796	138951	65177	54155	51465	4716	5134	4782	-
CACO-2_1	1	644	15439	29833	26162	26054	3534	3863	3589	193.2%
CACO-2_2	1	644	15439	30007	26301	26189	3533	3862	3587	194.4%
CACO-2_3	1	644	15439	30097	26365	26260	3535	3857	3590	194.9%
HeLa_1	1	644	15439	39385	33126	32894	4134	4519	4195	255.1%
HeLa_2	1	644	15439	42103	35403	35166	4136	4519	4197	272.7%
HeLa_3	1	644	15439	38897	32682	32469	4140	4520	4201	251.9%
MCF-7_1	1	644	15439	39812	33522	31403	4075	4433	4134	257.9%
MCF-7_2	1	644	15439	39856	33598	31483	4082	4440	4141	258.2%
MCF-7_3	1	644	15439	39750	33512	31377	4085	4440	4144	257.5%

Cada amostra foi injetada três vezes (replicatas de injeção) com o objetivo de avaliar o desempenho cromatográfico do Nexera Mikros em termos de reprodutibilidade cromatográfica e eficiência de separação. Nesta etapa, a reprodutibilidade da aquisição de dados de espectrometria de massas em modo DIA também pôde ser avaliada. Na Figura 03, são apresentados os resultados obtidos a partir do PEAKS Studio, sendo: A) o gráfico de shift da distribuição dos tempos de retenção e B) o boxplot da normalização das áreas (intensidades) para todas as amostras, considerando as triplicatas de injeção de cada uma das três linhagens celulares.

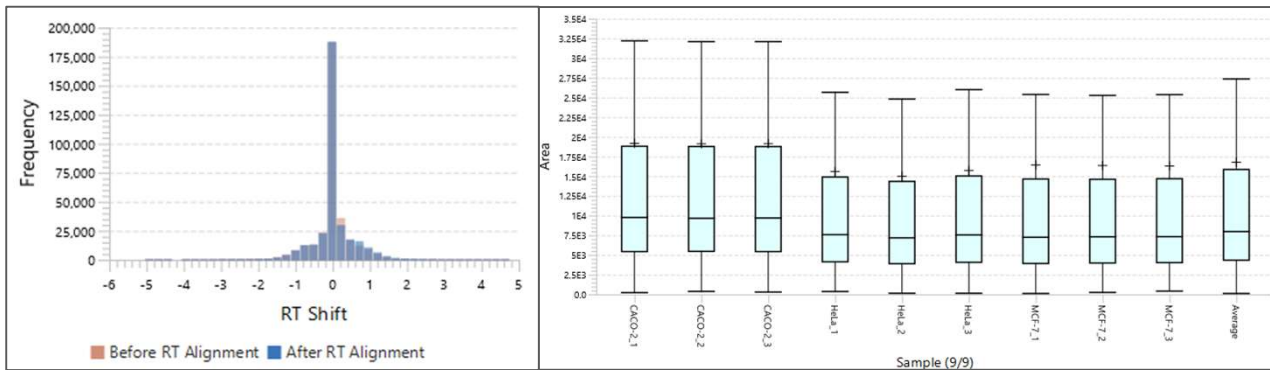


Figura 03. Avaliação da reprodutibilidade cromatográfica: **A)** shift da distribuição dos tempos de retenção e da reprodutibilidade de área: **B)** boxplot da normalização das áreas (intensidades).

A forte concentração do shift de tempo de retenção (Figura 03 A) em torno de zero após o alinhamento demonstra alinhamento cromatográfico eficiente e alta estabilidade entre as corridas, condição essencial para análises shotgun quantitativas em modo DIA. Os boxplots das áreas normalizadas (Figura 03 B) apresentam distribuições semelhantes entre replicatas e linhagens, com medianas consistentes e baixa dispersão, confirmando elevada reprodutibilidade quantitativa, eficiência da normalização e mínimo impacto de variabilidade técnica.

Na Figura 04, são apresentados os resultados de identificação de proteínas obtidos para cada uma das linhagens celulares, representados por diagramas de Venn. Os dados evidenciam a elevada reprodutibilidade instrumental da plataforma Nexera Mikros – LCMS-9050. Observa-se alta sobreposição de proteínas entre as injeções (74,9% em MCF-7; 75,5% em CACO-2; 76,3% em HeLa), associada a um baixo número de identificações exclusivas por corrida, confirmando a estabilidade cromatográfica, a consistência da aquisição em modo DIA e a robustez analítica do sistema em aplicações de proteômica shotgun.

A análise de PCA foi aplicada aos dados de proteômica para reduzir a complexidade do conjunto de dados e avaliar a variabilidade global entre as amostras (Figura 05). Essa abordagem facilita a avaliação da reprodutibilidade técnica, a identificação de padrões de similaridade entre amostras e a separação de grupos biológicos distintos, assegurando que as diferenças observadas reflitam variação biológica real e não artefatos analíticos.

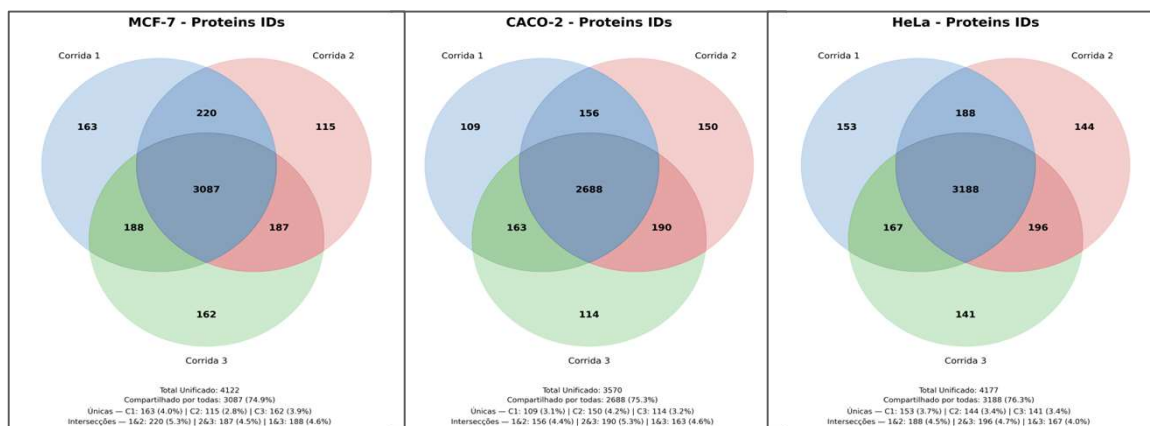


Figura 04. Diagrama de Venn para cada uma das linhagens analisadas: A) MCF-7; B) CACO-2 e C) HeLa. Dados oriundos de triplicatas de injeção.

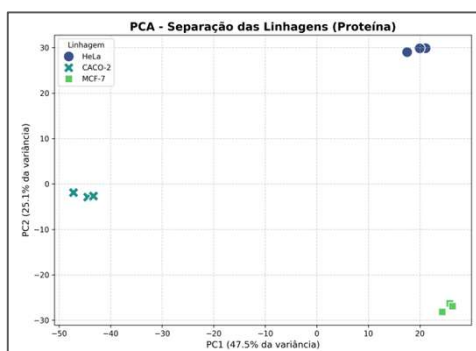


Figura 05. Análise de PCA dos perfis proteicos: clara separação entre as linhagens celulares.

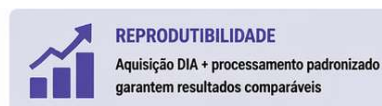
Com base nas intensidades proteicas, a PCA evidenciou separação clara entre as linhagens MCF-7, CACO-2 e HeLa, com os dois primeiros componentes explicando 72,6% da variância total (PC1: 47,5%; PC2: 25,1%). A clara distinção entre os clusters celulares confirma a capacidade da plataforma Nexera Mikros – LCMS-9050 de capturar diferenças biológicas reais sem introduzir variabilidade técnica significativa, reforçando a robustez do sistema para análises proteômicas shotgun quantitativas e comparativas.

Conclusão

O workflow descrito combina cromatografia de microfluxo real, ionização avançada multi-nozzle e aquisição DIA, resultando em alta sensibilidade, robustez e reprodutibilidade.

A consistência das identificações proteicas demonstra desempenho cromatográfico estável aliado à aquisição de dados em DIA com alta velocidade e acurácia, garantindo cobertura proteômica confiável mesmo em análises de larga escala. Esses resultados confirmam que a integração entre microfluxo e QTOF de alta resolução sustenta fluxos de trabalho proteômicos altamente reproduzíveis, adequados para estudos comparativos e aplicações que exigem elevada confiabilidade instrumental.

Os elevados níveis de sobreposição de proteínas identificadas entre as replicatas de injeção para as linhagens MCF-7, CACO-2 e HeLa evidenciam a robustez, estabilidade e reprodutibilidade analítica da plataforma Nexera Mikros acoplada ao LCMS-9050 em experimentos de proteômica *shotgun*.



Agradecimentos

Esta nota de aplicação é uma parceria entre a Shimadzu do Brasil e o Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe. O estudo foi financiado com recursos do PRONON/ Ministério da Saúde.



Use apenas para pesquisa. Não use em procedimentos de diagnóstico.

Esta publicação pode conter referências de produtos que não estão disponíveis na sua região. Entre em contato conosco para verificar a disponibilidade.

O conteúdo desta publicação não deve ser reproduzido, alterado ou vendido para qualquer propósito comercial sem a aprovação por escrito da Shimadzu.

Consulte <http://www.shimadzu.com/about/trademarks/index.html> para obter detalhes.

Marcas e nomes comerciais de terceiros podem ser usados nesta publicação para se referir às entidades ou seus produtos / serviços, sejam eles ou não são usados com o símbolo de marca comercial "TM" ou "®". O conteúdo desta publicação é baseado nas informações disponíveis para a Shimadzu na data de publicação ou antes dela, fornecido sem garantia de qualquer tipo, e esta sujeito a alterações sem aviso prévio. A Shimadzu não assume qualquer responsabilidade ou obrigação por qualquer dano, direto ou indireto, relativa à utilização desta publicação.

Primeira edição: Abril, 2026

Shimadzu do Brasil Comércio Ltda.

www.shimadzu.com.br

© Shimadzu do Brasil Comércio Ltda., 2026